

### **BAB III. METODE KERJA**

#### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mitra Anggrek Indonesia (MAI), Jalan Hasanuddin, Junrejo, Batu. Adapun waktu pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan Januari 2018 sampai Maret 2018.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar aie flow carbinet* (LAFC), autoklaf, botol kultur, cawan petri, *scalpel blade*, spatula, erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, bunsen burner, gelas ukur, timbangan analitik, spatula, lampu LED, *airconditioner* (AC), *hot plate (stirer)*, preparat, mikroskop binokuler, mikroskop digital, karet gelang, kertas saring, pH meter, alumunium foil, kertas saring, rak kultur, korek api dan kompor + tabung gas, panci, sprayer dan kamera DSLR (*Digital Single Lens Reflex*).

##### **3.2.2 Bahan**

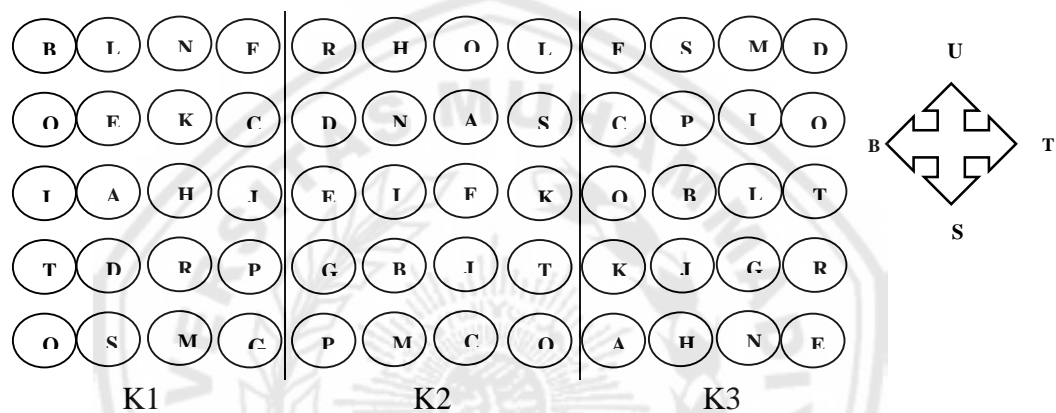
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Zat Pengatur Tumbuh sitokinin (*Thidiazuron*), ZPT auksin (*2,4-D Dichlorophenoxyacetic Acid*), plantlet *Agave sisalana* Perrine, alkohol, media Murashige & Skoog (MS), spirtus, air steril.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Kelompok Lengkap Teracak (RKLT) atau *Randomized Complete Block Design*

(RCBD) dengan faktor 1 adalah konsentrasi thidiazuron, terdiri atas  $T_{0,2}$ : TDZ 0,2 ppm,  $T_{0,4}$ : TDZ 0,4 ppm,  $T_{0,6}$ : TDZ 0,6 ppm,  $T_{0,8}$ : TDZ 0,8 ppm,  $T_{1,0}$ : TDZ 1,0 ppm dan faktor 2 adalah konsentrasi 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic Acid*), terdiri atas  $D_{0,5}$ : 2,4-D 0,5 ppm,  $D_{1,0}$ : 2,4-D 1,0 ppm,  $D_{1,5}$ : 2,4-D 1,5 ppm,  $D_{2,0}$ : 2,4-D 2,0 ppm.

Denah percobaan dapat dilihat pada Gambar 3, sebagai berikut:



Gambar 3. Denah Percobaan Penelitian

Keterangan :

A	:	$T_{0,2}$	$D_{0,5}$	:	TDZ 0,2 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
B	:	$T_{0,2}$	$D_{1,0}$	:	TDZ 0,2 ppm + 2,4-D 1,0 ppm
C	:	$T_{0,2}$	$D_{1,5}$	:	TDZ 0,2 ppm + 2,4-D 1,5 ppm
D	:	$T_{0,2}$	$D_{2,0}$	:	TDZ 0,2 ppm + 2,4-D 2,0 ppm
E	:	$T_{0,4}$	$D_{0,5}$	:	TDZ 0,4 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
F	:	$T_{0,4}$	$D_{1,0}$	:	TDZ 0,4 ppm + 2,4-D 1,0 ppm
G	:	$T_{0,4}$	$D_{1,5}$	:	TDZ 0,4 ppm + 2,4-D 1,5 ppm
H	:	$T_{0,4}$	$D_{2,0}$	:	TDZ 0,4 ppm + 2,4-D 2,0 ppm
I	:	$T_{0,6}$	$D_{0,5}$	:	TDZ 0,6 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
J	:	$T_{0,6}$	$D_{1,0}$	:	TDZ 0,6 ppm + 2,4-D 1,0 ppm
K	:	$T_{0,6}$	$D_{1,5}$	:	TDZ 0,6 ppm + 2,4-D 1,5 ppm
L	:	$T_{0,6}$	$D_{2,0}$	:	TDZ 0,6 ppm + 2,4-D 2,0 ppm
M	:	$T_{0,8}$	$D_{0,5}$	:	TDZ 0,8 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
N	:	$T_{0,8}$	$D_{1,0}$	:	TDZ 0,8 ppm + 2,4-D 1,0 ppm
O	:	$T_{0,8}$	$D_{1,5}$	:	TDZ 0,8 ppm + 2,4-D 1,5 ppm
P	:	$T_{0,8}$	$D_{2,0}$	:	TDZ 0,8 ppm + 2,4-D 2,0 ppm
Q	:	$T_{1,0}$	$D_{0,5}$	:	TDZ 1,0 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
R	:	$T_{1,0}$	$D_{1,0}$	:	TDZ 1,0 ppm + 2,4-D 1,0 ppm
S	:	$T_{1,0}$	$D_{1,5}$	:	TDZ 1,0 ppm + 2,4-D 1,5 ppm
T	:	$T_{1,0}$	$D_{2,0}$	:	TDZ 1,0 ppm + 2,4-D 2,0 ppm

Denah percobaan dibuat berdasarkan rancangan penelitian. Perlakuan diacak pada setiap kelompok, sehingga dilakukan pengacakan sebanyak 3 kali.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Sterilisasi Alat**

Menurut Prayoga (2015) bahwa sterilisasi mempunyai peranan penting dalam keberhasilan teknik kultur jaringan. Guna mencegah terjadinya kontaminasi maka perlu dirancang suatu laboratorium atau ruang kerja kultur jaringan yang khusus, terpisah antara bagian persiapan, pembuatan media dan ruang penabur (penanaman). Alat- alat yang digunakan selama kultur harus terlebih dahulu dibersihkan menggunakan sabun cuci bagian luar dan dalam serta meniriskan hingga kering di krat. Botol yang sudah kering kemudian dimasukkan dalam *autoclave*, cawan petri yang sudah kering dibungkus menggunakan kertas dan memasukkannya ke dalam *autoclave*, serta alat-alat yang lain seperti pipet ukur, erlenmeyer mensterilkan dalam *autoclave*. Alat-alat tersebut disterilkan dengan suhu 121°C dengan tekanan 17.5 psi selama 15 menit.

#### **3.4.2 Pembuatan Larutan Stok**

Pembuatan larutan stok dengan menyiapkan bahan-bahan senyawa kimia yang ada dalam media MS. Menghitung dan menimbang bahan-bahan sesuai dengan masing-masing senyawa kimia dengan konsentrasi 100 ppm. Memasukkan senyawa kimia yang sudah disipakan ke dalam Erlenmeyer dan menambahkan air steril sampai volumenya 100 ml. mengaduk larutan tersebut menggunakan spatula dan meletakkan pada stirrer sampai benar-benar larut dan merata. Memindahkan

larutan tersebut ke dalam botol dan menyimpannya ke dalam kulkas agar tidak cepat rusak.

### 3.4.3 Pembuatan Media

Menyiapkan media MS yang akan tambahkan dengan hormone atau ZPT perlakuan sesuai dengan yang ditentukan. Jika membuat media untuk 1 liter atau 1000 ml, maka mengambil masing - masing larutan stok 10 ml, lalu memasukkan ke dalam wadah, setelah larutan stok masuk menambahkan dengan zat pengatur tumbuh sitokinin (*Thidiazuron*/TDZ) dan auksin (2,4-D) sesuai perlakuan. Selanjutnya menambahkan sukrosa sebanyak 3000 mg, menambahkan dengan air aquadest steril hingga 1000 ml. Mengukur pH menggunakan pH meter hingga mencapai 5,6 - 5,8. Memasak larutan yang ada dalam wadah dan memasukkan kedalam panik sambil diaduk hingga mendidih. Memasukkan media kedalam botol kultur serta menutupnya dengan rapat dan memberi label nama pada botol. Selanjutnya memasukkan kedalam autoclave untuk disterilkan medianya, selama 15 menit dengan tekanan 17.5 psi.

### 3.4.4 Penanaman plantlet Agave

Penanaman plantlet Agave dilakukan didalam LAF. Bahan yang digunakan berasal dari eksplan aseptik. Pemotongan plantlet *Agave sisalana* Purrine berumur 2 bulan dengan memisahkan perhelai daun *Agave sisalana*. Helaian daun tersebut dipotong dan dihilangkan bagian tepi daun, pemotongan plantlet kira - kira berukuran (0,5-1) cm dan bagian tepi *Agave sisalana* disayat atau dilukai menggunakan *scalpel blade*, untuk kemudian ditanam ke dalam botol media + ZPT yang sudah di panaskan bibir botolnya, kemudian menutup dan di

inkubasi. Menurut Dodds dan Roberts (1983), pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Kalus juga dapat terbentuk sebagai akibat stress (George & Sherrington, 1984). Menutup kembali botol tersebut kemudian di inkubasi di rak kultur.

### 3.5 Variabel Pengamatan

Pengamatan pada penelitian ini dilakukan setiap hari guna mengetahui saat muncul kalus, dengan variabel pengamatan sebagai berikut:

#### 1. Saat inisiasi

Selama masa inkubasi eksplan agave mengalami inisiasi yang ditandai dengan mulai terjadinya pembelahan sel yang terus menerus pada jaringan induk, seperti membengkak atau melengkung yang tidak perlu harus berhubungan langsung dengan medium kultur (Luqman, 2012). Menurut (Sutriani, 2014) bahwa inisiasi diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengamati seluruh bagian eksplan *Agave sisalana*.


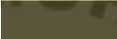






#### 2. Saat berkalus.

Kalus dinyatakan terbentuk, apabila terbentuk suatu massa sel yang tidak terorganisasi atau tidak terdeferensiasi menjadi organ tanaman induknya (George, 1984; Bhojwani, 1983; Dodds, 1982). Mengamati dengan cara visual keseluruhan bagian eksplan *Agave sisalana* setiap hari sampai kalus muncul.

### 3. Warna kalus

Mengamati warna kalus dengan cara membandingkan dengan skoring warna *Munsell* setiap 7 hari sekali. Nilai dan notasi pada setiap warna yang digunakan dihitung menggunakan *Munsell conversion color system CMC 16a*.

Tabel 1. Skoring Warna *Munsell*

No	Red	Green	Blue	Colour	Hue	Value	Chroma
1	165	165	99		.56GY	6,52	4,85
2	73	69	41		8.28Y	2,75	3
3	118	147	60		5.57GY	5,59	7,22
4	0	128	0		9.30GY	4,52	11,49
5	0	204	0		9.71GY	7,05	16,31
6	77	166	10		8.24GY	5,94	12,47
7	137	229	25		7.56GY	8,16	14,02
8	204	255	51		5.60GY	9,27	12,68

Sumber : *Munsell conversion color system CMC 16 a*.

Menurut Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau, sedangkan warna yang terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik (Andaryani, 2010).

### 4. Tekstur kalus

Mengamati seluruh bagian eksplan setiap hari, tekstur kalus dapat digolongkan dalam 2 kelompok yakni bertekstur kompak (*non-fiable*) dan remah (*friable*). Kalus dikatakan kompak dengan ciri - ciri antara satu sel dengan yang lain sulit dipisahkan dan cenderung padat menggumpal, kalus bertekstur kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat) (Ariati, 2012). Sedangkan kalus remah

memiliki ciri-ciri ikatan antar selnya tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika di ambil dengan pinset, kalus mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset, kalus remah terlihat memiliki sel - sel yang kecil dan bergerombol dan jika diambil sel - selnya mudah lepas (Lizawati, 2012).

##### 5. Pengamatan histologi

Preparat histologi dibuat dari kalus *Agave sisalana* yang berumur 30 HSI. Pembuatan preparat dilakukan di Fakultas Biologi UGM. Pengamatan histologi untuk mengetahui struktur jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada sediaan jaringan yang dipotong tipis (Wikipedia, 2017).

##### 6. Perubahan Warna (*Browning*) Kalus *Agave sisalana*

Bhojwani & Razdan (1983) bahwa pada kultur *in vitro* beberapa spesies tanaman dapat menyebabkan terjadinya oksidasi substansi fenolik yang dilepaskan oleh eksplan melalui permukaan dan umumnya menyebabkan browning pada medium yang bias meracuni jaringan eksplan yang ditanam. Waktu rata-rata eksplan mengalami browning 35 hari setelah tanam (Admojo, dkk.,2016). Pengamatan perubahan warna (*Browning*) pada kalus *Agave sisalana* dengan mengamati seluruh bagian eksplan *Agave sisalana* setiap 1 kali dalam seminggu selama 4 minggu.

### 3.6 Analisis dan Penyajian Data

Data yang terkumpul akan dianalisis dengan uji F BNJ (Uji Beda Nyata Jujur) taraf 5%. Uji F digunakan untuk melihat pengaruh semua variabel bebas secara bersama-sama. Sedangkan BNJ digunakan untuk membandingkan hasil dari semua perlakuan.





